Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. E. Bock

Untersuchungen über die Eigenschaften der Thymidin-Kinase in normalen und leukämischen myeloischen Zellen des Blutes und des Knochenmarkes

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Bernd Frederich
aus Stolp/Pommern

1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547611_0109

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. E. Bock

Untersuchungen über die Eigenschaften der Thymidin-Kinase in normalen und leukämischen myeloischen Zellen des Blutes und des Knochenmarkes

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Bernd Frederich
aus Stolp/Pommern

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. W. Graumann

1. Berichterstatter: Oberarzt Dozent Dr. W. Wilmanns
2. Berichterstatter: Professor Dr. H.E. Bock

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v.Spangenberg KG • Tübingen

Meiner Mutter

in Damkbarkeit zugeeignet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
Abkürzungen	4
II. METHODIK	4
1. Materialien	4
2. Isolierung und Extraktion von Leukocyten .	5
3. Enzym-Untersuchungen	5
III. ERGEBNISSE	9
1. Eigenschaften der Thymidin-Kinase	9
2. Hemmversuche mit Thymidintriphosphat (TTP)	14
3. Inhibitorwirkung normaler Leukocyten auf die Thymidin-Kinase in Leukämiezellen ...	23
4. Beziehung zwischen der Aktivität der Thymidin-Kinase und dem Anteil myeloischer Vorstufen im peripheren Blut	26
IV. DISKUSSION	33
1. Thymidin-Kinase und Proliferation myeloischer Zellen	33
2. Thymidin-Kinase und Thymidintriphosphat .	35
V. ZUSAMMENFASSUNG	37
Tabellarischer Anhang 1 - 6	
VI. LITERATUR	39

I. EINLEITUNG

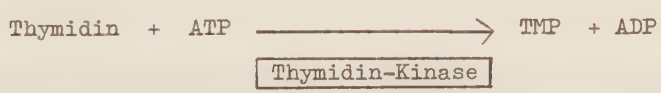
Bei der DNS-Synthese ist die Bildung von Thymidinnucleotiden von entscheidender Bedeutung. Denn die DNS - im Unterschied zur RNS, die die Pyrimidinbase Uracil enthält - besitzt Thymin, neben Adenin, Guanin und Cytosin.

Wie in proliferierenden Geweben und in Bakterien gezeigt werden konnte, gibt es zwei differente Wege zur Bildung von Thymidinnucleotiden:

1. De novo Synthese: CO_2 (34) und NH_3 reagieren mit ATP zum Carbamylphosphat (44, 45, 47). Letzteres wird auf die L-Asparaginsäure übertragen (48, 63). Bei dieser Reaktion wurde das erste Mal der Wirkungsmechanismus einer allosterischen Hemmung nachgewiesen (38, 73).

   Weitere Schritte führen zum Desoxyuridin-5'-monophosphat (dUMP). Dieses wird tetrahydrofolatabhängig (5, 34, 36, 67, 70 u.71) über die Thymidylat-Synthetase (6, 7, 35, 27, 59, 68, 60) zum Thymidin-5'-monophosphat (TMP = Thymidylsäure) methyliert.

2. ATP-abhängige Phosphorylierung von vorgebildetem Thymidin durch die Thymidin-Kinase zu Thymidin-5'-monophosphat (4, 22, 61, 69, 13). Siehe Gleichung 1.



Gleichung 1

Diese Reaktion wurde in zahlreichen proliferierenden Geweben nachgewiesen (3, 43, 61, 69). Thymidin Quellen ergeben sich aus dem Abbau von Nucleotiden (17) und aus der Nahrung (24, 64). Während sich in der normalen Rattenleber praktisch keine Thymidin-Kinase nachweisen läßt (43), sind dagegen in einer regenerierenden Rattenleber deutliche Aktivitäten der

Thymidin-Kinase meßbar (3, 15, 21, 22, 43 69). Das Enzym findet sich also in DNS-synthetisierenden Zellen.
Das durch die Thymidin-Kinase gebildete Thymidinmonophosphat wird über Thymidindi- zu -triphosphat phosphoryliert, um dann mittels der DNS-Polymerase in das DNS Molekül eingebaut zu werden (62). Diese Reaktionen sind, wie oben angeführt, nur in teilungsfähigem Gewebe möglich und es konnte hierzu gesichert werden, daß vor jeder DNS-Vermehrung, welche in Schüben vorsichgeht, ein signifikanter Anstieg der Thymidin-Kinase zu verzeichnen ist (66, 28, 12).

Abb. 1 ———

Eine Schlüsselstellung in diesem Cyclus nimmt das Thymidintriphosphat (TTP) ein, indem es in Abhängigkeit von seiner Konzentration die Thymidin-Kinase durch einen negativen Rückkopplungseffekt reguliert und damit die DNS-Synthese und die Zellprolieferation (siehe Abb. 1). Diese Hemmung wurde durch Untersuchungen an regenerierender Rattenleber von BREITMANN (11), am Novikoff-Hepatom von IVES, MORSE und POTTER (46), und an Leukocyten von BRESNICK und KARJALA (14, 71) nachgewiesen. Nach MALEY und MALEY wird durch TTP außerdem die enzymatische Bildung von Desoxyuridin-5'-monophosphat (dUMP) durch Phosphorylierung von Desoxyuridin und durch Desaminierung von Desoxycytidin-5'-monophosphat (dCMP) gehemmt (53). Die Enzyme der tetrahydrofolat-abhängigen Thyminmethylgruppen - de novo-Synthese: FH_2-Reduktase und Thymidylat-Synthetase werden durch TTP nicht beeinflußt (71).

Ziel der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen ist, die optimalen Bedingungen für die Aktivität der Thymidin-Kinase in normalen und leukämischen menschlichen Blut- und Knochenmarkzellen festzustellen und den Hemmechanismus von Thymidintriphosphat auf die Thymidin-Kinase zu untersuchen (8, 71).

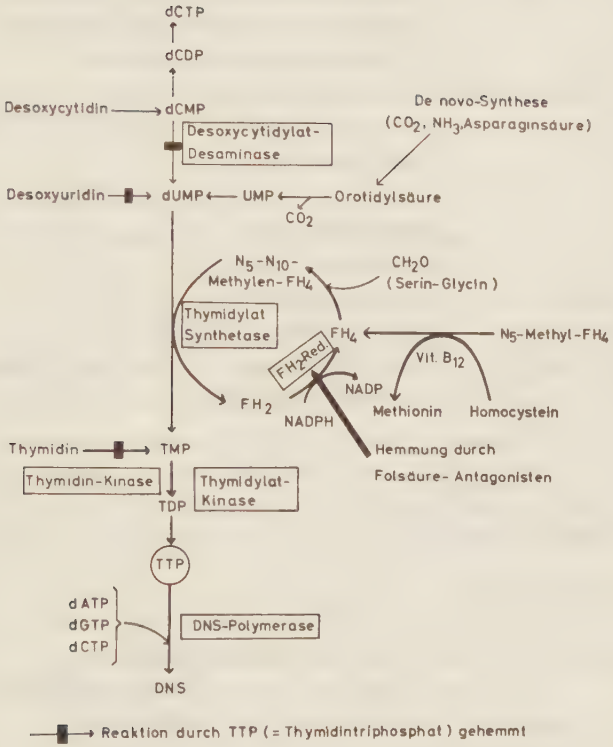


Abb. 1: Schematische Darstellung der Thyminnucleotid-Synthese, ihrer Regulation durch TTP und Hemmung durch Folsäure-Antagonisten.
(Nach W.Wilmanns: Die Thymidin-Kinase in normalen und leukämischen myeloischen Zellen. Klin.Wschr. 45, 505-511,(1967) (71).

Abkürzungen:

AMP, ADP, ATP	Adenosinmono-, -di-, -triphosphat.
CLL	Chronische lymphatische Leukämie.
CML	Chronische myeloische Leukämie.
dATP	Desoxyadenosintriphosphat.
dCMP, dCDP, dCTP	Desoxycytidinmono-, -di-, -triphosphat.
dCR	Desoxycytidin.
dTR	Thymidin.
dUMP	Desoxyuridinmonophosphat.
dUR	Desoxyuridin.
PEP	Phosphoenolpyruvat.
PK	Pyruvat-Kinase.
S.A.	Spezifische Aktivität
TMP, TDP, TTP	Thymidinmono-, -di-, -triphosphat.
UMP	Uridinmonophosphat.

II. METHODIK

1. Materialien:

Thymidin ^{14}C spez. Aktivität 58 mC/mMol,
the Radiochemical Center Amersham/England.

ATP	(Adenosin-5'-triphosphat)	Boehringer
PEP	(Phosphoenolpyruvat)	Boehringer
PK	(Pyruvat-Kinase)	Boehringer
TTP	(Thymidin-5'-triphosphat)	SERVA Heidelberg

2. Isolierung und Extraktion von Leukocyten:

Die Isolierung und Extraktion von Leukocyten und Knochenmarkszellen erfolgte nach der von WILMANNS angegebenen Methode (71).

3. Enzym-Untersuchungen:

a) Thymidin-Kinase:

Die Enzym-Aktivitätsbestimmungen erfolgten in Anlehnung an eine von BOLLUM und POTTER sowie von BRESNICK und KARJALLA angegebene Methode (10, 14). Es wird ein Aliquot Leukocytencytolysat, welches zuerst mit ^{14}C-Thymidin, ATP und Magnesium-Ionen inkubiert und dann durch Hitze enteiweißt worden war, auf ein DEAE-Cellulosepapierscheibchen gegeben. Nachdem durch mehrmaliges Waschen mit verdünntem Ammoniumformiat und folgender Behandlung mit Äthanol Thymidin extrahiert worden ist, kann die auf den Scheibchen verbliebene in TMP fixierte ^{14}C-Aktivität im Liquidszintillationspektrometer gezählt werden.

Standard-Inkubationsansätze enthielten in 0,5 ml:

20	µMol TRIS pH 8,0
5	µMol $MgCl_2$
2,5	µMol Mg-Titriplex
2,5	µMol ATP
0,028	µMol ^{14}C-Thymidin (28 µMol/0,02 ml)

Cytolysat von 3 - 5 x 10^7 weißen Blutzellen.

Die Ansätze wurden 60 Minuten bei 37 °C inkubiert, dann durch Hitze (1-2/min bei 100 °C) enteiweißt und zentrifugiert. 0,025 ml der Überstände (1/20 des Gesamtansatzes) wurden auf quadratische, 1,5 cm^2 große DEAE-Cellulose-Papierscheibchen (Whatman Ion Exchange, Grade DF 81) aufgetragen und diese sofort in 20 ml 0,001 M Ammoniumformiat gelegt. Nach 10 Minu-

ten wurde die Lösung abgegossen. Die Papierscheibchen wurden zweimal mit Wasser gewaschen. Nach erneuter Behandlung mit 20 ml 0,001 M Ammoniumformiat mit folgendem zweimaligem Waschen wurden die DEAE-Cellulose-Scheibchen 5 Minuten lang mit 10 ml 95 %igem Äthanol behandelt. Thymidin-^{14}C wird dabei durch den Alkohol extrahiert, während die Thymidylsäure-^{14}C auf dem Papier fixiert bleibt. Die Papierscheibchen wurden bei 80 °C getrocknet und in 15 ml Scintillatorlösung (4 g Diphenyloxazol und 100 mg 1,4- bis 2 (5-Phenyloxazol)-Benzen gelöst in 1000 ml Toluol) aufgenommen. Die Auszählung der in Thymidylsäure inkorporierten ^{14}C-Aktivität erfolgte im TRI-CARB Liquid Scintillation Spectrometer (Fa. Packard Instrument Company). Die Ergebnisse wurden durch einen Leerwert (Ansatz ohne Enzym) korrigiert. Standardpräparate wurden angefertigt durch Auftragen von 0,025 ml des 1 : 5 verdünnten Überstandes (1/100 des Gesamtansatzes) auf DEAE-Cellulose-Scheibchen, die anschließend bei 80 °C getrocknet wurden.

Die in ihnen ermittelte Aktivität betrug je nach der spezifischen Radioaktivität der verwendeten Thymidin-^{14}C-Lösung 30000 - 50000 Imp/min/mµMol.

Die Berechnung der gebildeten Menge Thymidylsäure erfolgte aus den in den Inkubationsansätzen ermittelten Impulsraten und der spezifischen Aktivität des Vergleichstandards.

$$\frac{\text{Imp/min des Inkubationsansatzes}}{\text{Imp/min/mµMol Thymidin-}^{14}\text{C}} = \text{mµMol TMP}$$

Beispiel der Berechnung einer spezifischen Enzym-Aktivität (S.A.)

Thymidin-^{14}C Ausgangslösung : 28 mµMol/0,02 ml

Inkubationsvolumen : 0,5 ml

1. Standard:

Es wurde 1/100 des Überstandes im TRI-CARB 1 Minute lang ausgezählt.

$$S.A. = \frac{cpm \times 100}{28} = cpm/m\mu Mol\ Thymidin\text{-}^{14}C \text{ der Thymidin-Lösung}$$

2. Enzym-Ansatz:

Es wurde 1/20 des Überstandes im TRI-CARB 1 Minute lang ausgezählt.

a) $A\ (Aktivität) = \frac{(cpm - Leerwert) \times 20}{S.A.\ der\ Thymidin\text{-}Lösung}$

Leerwert = Ansatz ohne Enzym.

b) $m\mu Mol\ Substratumsatz/h/10^7\ Zellen = \frac{A}{x\ (10^7\ Zellen)}$

$S.A. = m\mu Mol\ Substratumsatz/min/10^{10}\ Zellen$

$$= \frac{A}{x\ (10^7\ Zellen)} \times \frac{1000}{60} = \frac{A}{x\ (10^7\ Zellen)} \times 16{,}7$$

Eine Berechnung aus 4 Beispielen des mittleren Fehlers der Einzelbestimmung nach

$$\pm \sqrt{\frac{\Sigma(x - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

ergab eine Abweichung von $\pm$ 418 cpm .

Eine Berechnung aus 17 Beispielen des mittleren Fehlers des Leerwertes nach

$$\pm \sqrt{\frac{\Sigma(x - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

ergab eine Abweichung von $\pm$ 1721 cpm

b) Die Abtrennung der TK von Nucleotiden:

Die Abtrennung der TK von Nucleotiden erfolgt durch Absorption des enteiweißten Inkubationsansatzes an Sephadex G 25, Partikelgröße 20-80 µ und folgender Elution.

Im einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen:
- Sephadex 12 Stunden im Kühlschrank in Aqua bidest quellen lassen.
- Kleine Partikel von der Oberfläche absaugen.
- In Saugflasche evakuieren.
- Brei mit Aqua bidest verrühren, dann die Elutionssäule (Höhe: 20 cm, Durchmesser: 1,5 cm) bis zur Hälfte mit dem Sephadex-Brei auffüllen.
- Enzym in Portionen von 0,1 - 0,2 ml auf die Säule geben.
- Nach der letzten Enzymzugabe wird TRIS 0,05M pH 8,0 auf die Säule nachgegeben.
- Die Eluate werden in 1 ml Fraktionen aufgefangen.
- Proteinbestimmung in den einzelnen Fraktionen mit je 0,05 ml Eluat. Ebenso Proteinbestimmungen im Cytolysat.
- Enzym-Aktivitätsbestimmungen mit gleichen Proteinmengen aus Cytolysat und Eluat.

c) Proteinbestimmung nach BÜCHER (19):

Die Eiweißkonzentrationen werden nephelometrisch bestimmt. Trichloressigsäure erzeugt in Lösungen einer bestimmten Salzkonzentration haltbare Trübungen, die der Eiweißkonzentration proportional sind. Die entsprechend verdünnte Proteinlösung wird mit Aqua bidest auf 1 ml aufgefüllt und mit 2 ml Bücher-Lösung (1 Teil 1M Trichloressigsäure auf 2 Teile 1 %iger Ammoniumsulfat) sorgfältig vermischt. Nach 20 Minuten wird im Zeiss-Spektral-Photometer PMQ II bei λ = 540 mµ gegen eine auf gleiche Weise erzeugte Trübung bekannter Mengen von Humanalbumin "reinst" (Behringwerke AG, Marburg/Lahn) gemessen. Die Eichkurve verläuft linear zwischen 50 und 200 µg Protein im Inkubationsansatz.

III. ERGEBNISSE

1. Eigenschaften der Thymidin-Kinase:

a) Abhängigkeit von der Enzymkonzentration

Aus Abb. 2 ist ersichtlich, daß sich die gebildete Menge Thymidinmonophosphat proportional zur eingesetzten Enzymkonzentration verhält.

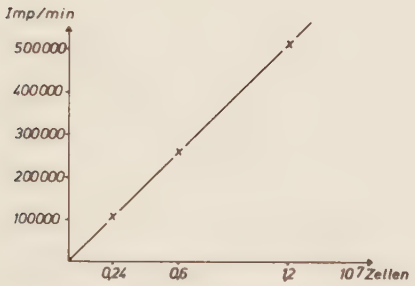


Abb. 2: Aktivität der Thymidin-Kinase in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration.
Pat. Be, männlich, 35 J., akute Leukose, periphere Leukocyten (96 % Paraleukoblasten).

b) Abhängigkeit von der Zeit.

Über 60 Minuten verläuft der Substratumsatz in linearer Abhängigkeit von der Zeit. Anschließend vermindert sich der Substratumsatz, was Folge einer nicht mehr genügend vorhandenen Substratkonzentration sein kann. (Abb. 3).

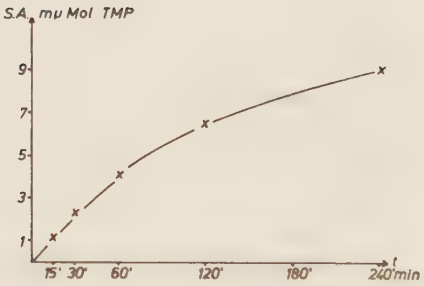


Abb. 3: Aktivität der Thymidin-Kinase in Abhängigkeit von der Zeit.

Pat. Pi, weiblich, 20 J., akute Leukose, periphere Leukocyten (52 % Paraleukoblasten).

c) pH - Optimum.

Wie Abb. 4 zeigt, liegt das pH-Optimum der Thymidin-Kinase zwischen pH 7,6 und 8,2. Deshalb wurden in Übereinstimmung mit BRESNICK und THOMPSON (16) sämtliche Versuche bei einem pH von 8,0 durchgeführt.

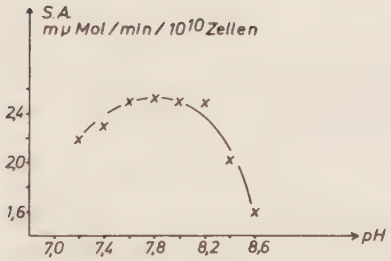


Abb. 4: Aktivität der Thymidin-Kinase in Abhängigkeit vom pH. Ausgehend vom Routine-Ansatz wurden die pH-Werte jeweils um 0,2 von pH 7,0 bis pH 8,6 mit TRIS-Puffer von pH 7,0 und 8,4 und 1 nHCl verändert.

Pat. Ke., männlich, 70 J., chronische Myelose, periphere Zellen, 9 % Paramyeloblasten.

d) Bedeutung einzelner Komponenten für die Aktivität der Thymidin-Kinase.

Ansatz	S.A. mμMol/min/ 10^{10} Zellen	Aktivität %
Vollständiger Ansatz	2,64	100
ohne ATP	0,10	3,8
ohne $MgCl_2$	0,57	22
ohne $MgCl_2$, ohne Mg-Titriplex	0,34	13
ohne $MgCl_2$, ohne Mg-Titriplex plus 2,5 μMol Titriplex III	0,058	2
plus PEP und PK	1,83	69

Tab. 1: Aktivität der Thymidin-Kinase in Abhängigkeit der Komponenten ATP, $MgCl_2$, Mg-Titriplex, PEP und PK.

Pat.: Kr., weiblich, 31 J., periphere Zellen 76 % Paramyeloblasten.

Tabelle 1 zeigt, daß ohne ATP praktisch kein Thymidinmonophosphat durch die Thymidin-Kinase gebildet wird. Ebenso wird deutlich, daß durch Fehlen von Mg-Ionen der Substratumsatz erheblich geringer wird. Bei Zugabe von Titriplex III, welches Mg-Ionen bindet, findet kein Substratumsatz mehr statt. Mg-Ionen sind also für die Thymidin-Kinase-Reaktion essentiell notwendig.

Aus Tabelle 1 und Abbildung 5 ist außerdem ersichtlich, daß das ATP regenerierende System PEP und PK (16) nicht wie erwartet den Substratumsatz erhöht, sondern diesen eher erniedrigt. Diese erniedrigte Enzymaktivität kann aber gegebenenfalls scheinbar sein, da in Gegenwart des ATP-regenerierenden Systems TMP weiter zu TDP und TTP phosphoryliert werden kann. BUKOVSKY und ROTH fanden keinen Einfluß von PEP und PK auf den Substratumsatz der Thymidin-Kinase (21).

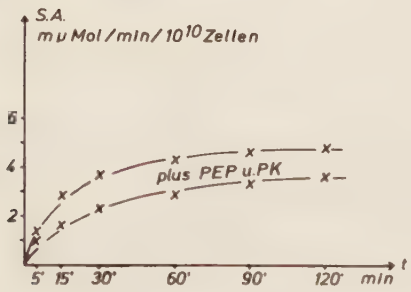


Abb. 5: Aktivität der Thymidin-Kinase in Abhängigkeit von der Zeit und von PEP und PK.

Pat.: Ju., weiblich, 62 J., chronische Myelose, periphere Zellen, 74 % Paramyeloblasten.

2. Hemmversuche mit Thymidintriphosphat (TTP)

a) Substrateinfluß und Hemmung durch TTP.

In den Abbildungen 6a - d ist für 4 Patienten die Bedeutung der Thymidin-Konzentration für die Aktivität der Thymidin-Kinase wiedergegeben. Bei niedriger Substrat-Konzentration in Bereichen von 1,4 - 5,6 x 10^{-5} M Thymidin-^{14}C steigt die Aktivität mit Erhöhung der zugegebenen Thymidinmenge deutlich an. Bei höherer Substrat-Konzentration - 11,2 x 10^{-5} M - ändert sich die Menge von gebildetem TMP nur noch geringgradig. Es findet somit eine Sättigung des Enzyms Thymidin-Kinase mit dem Substrat Thymidin-^{14}C statt. Spezifische Enzym-Aktivitäten und K_m-Werte der einzelnen untersuchten Patienten sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Bei Zusatz von TTP wird weniger TMP gebildet: TTP wirkt somit hemmend auf den Substratumsatz.

In den Abb. 6a - d sind die reziproken Werte der Reaktionsgeschwindigkeiten (V) als Funktion der reziproken Thymidin-Konzentrationen (S = Substrat-Konzentration) nach der von LINEWEAVER und BURK angegebenen Methode mit und ohne TTP-Zusatz aufgetragen (50). Der Schnittpunkt der Kurven mit und ohne Inhibitorzusatz liegt bei allen Patienten in der Ordinate. Der Zusatz von TTP bewirkt somit eine scheinbare Vergrößerung der Michaelis-Konstanten für Thymidin. Dieses bedeutet, daß sich die maximale Reaktionsgeschwindigkeit nicht ändert. Ein gleichartiger Kurvenverlauf konnte bei insgesamt 13 Patienten nachgewiesen werden. Daraus folgt, daß die Hemmung der Thymidin-Kinase unter den Versuchsbedingungen vom kompetitiven Typ sein muß, d.h., die Hemmung ist reversibel durch Erhöhung der Thymidin-Konzentration.

Die Berechnung der K_m (Michaelis-Konstante) für Thymidin^{14}C und der K_i (Hemmkonstante) für TMP erfolgte nach LINEWEAVER und BURK (50).

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}}$$

$$K_m = S \left(\frac{V_{max}}{V} - 1 \right)$$

$$\frac{1}{V_i} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} \cdot \frac{(1 + (J))}{K_i} + \frac{1}{V_{max}}$$

Substrat-Konzentration = S (10^{-6} M Thymidin),

Reaktionsgeschwindigkeit = V (10^{-6} M TMP/min/10^{10}Zellen im Inkubationsansatz gebildet),

Inhibitor-Konzentration = J.

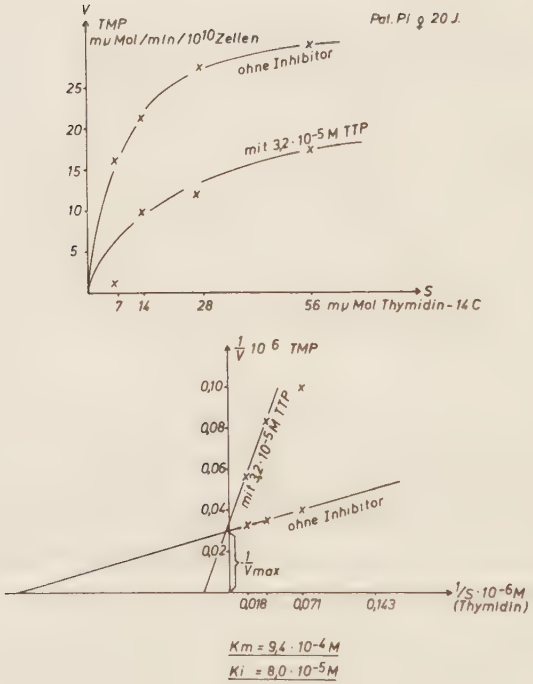


Abb. 6a: Aktivität der Thymidin-Kinase in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge Thymidin-^{14}C und von TTP.

Pat.: Pi., weiblich, 20 J., akute Leukose, periphere Zellen, 4 % Paramyeloblasten.

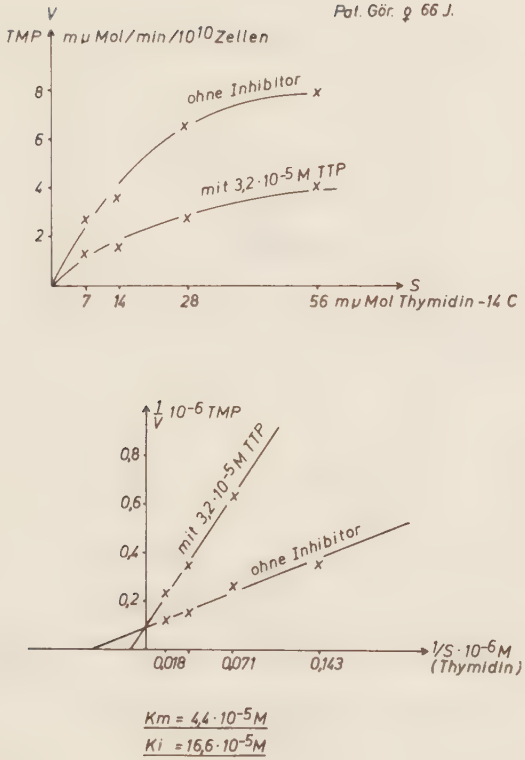


Abb. 6b: Aktivität der Thymidin-Kinase in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge Thymidin-^{14}C und von TTP.

Pat.: Gör., weiblich, 66 J., akute Leukose, periphere Zellen, 76 % Paramyeloblasten.

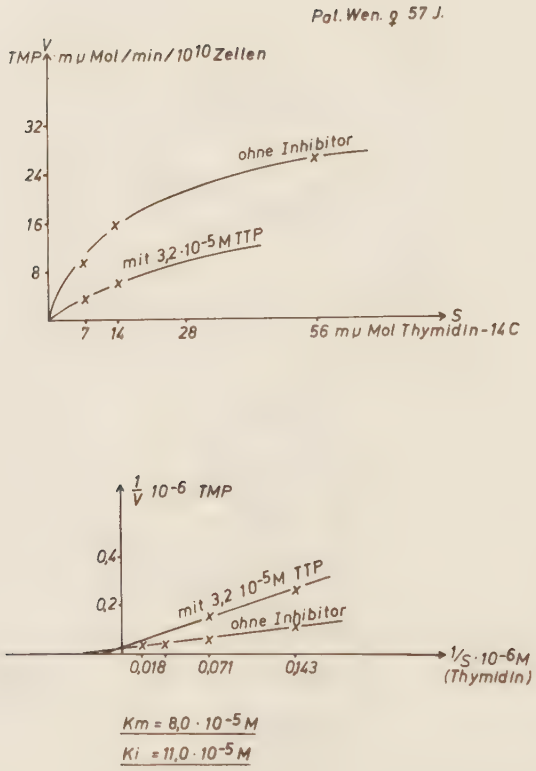


Abb. 6 c: Aktivität der Thymidin-Kinase in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge Thymidin-^{14}C und von TTP.

Pat.: Wen., weiblich, 57 J., akute Leukose, periphere Zellen, 77 % Paramyeloblasten.

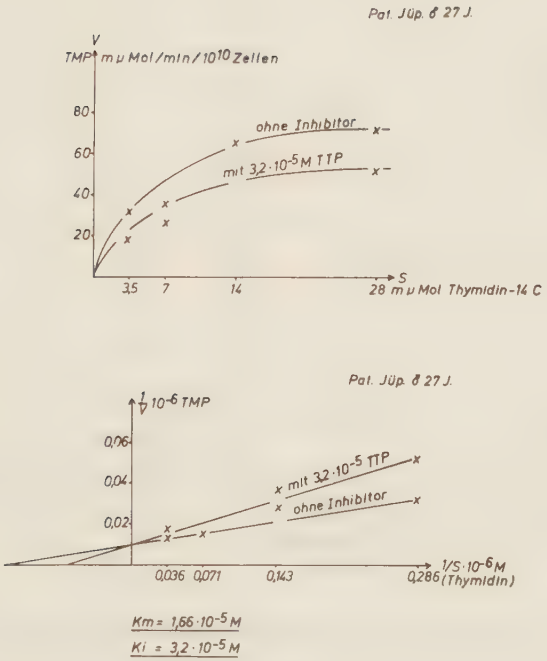


Abb. 6d: Aktivität der Thymidin-Kinase in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge Thymidin-^{14}C und von TTP.

Pat.: Jüp., männlich, 27 J., akute Leukose, periphere Zellen, 41 % Paramyeloblasten.

Patient	Diagnose	S.A. muMol/min/ 10^{10} Zellen	K_m (M)
Jüpt	akute L.	72,8	$1,66 \times 10^{-5}$
Krau	"	6,1	$5,0 \times 10^{-5}$
Gör	"	6,6	$4,4 \times 10^{-5}$
Gör	"	6,1	$1,5 \times 10^{-5}$
Schm.Ol.	"	10,7	$5,8 \times 10^{-5}$
Hausm.	"	12,5	$3,4 \times 10^{-5}$
Pip	"	27,5	$9,4 \times 10^{-4}$
Wen	"	26,6	$8,0 \times 10^{-5}$
Fried	chronische L.	1,15	$2,56 \times 10^{-5}$
Blo	"	8,8	$7,2 \times 10^{-5}$
Jun	"	0,84	$7,9 \times 10^{-4}$
Jun	"	2,5	$1,3 \times 10^{-5}$
Schm.R.	"	3,2	$3,34 \times 10^{-5}$

Tab. 2: Spezifische Aktivitäten (S.A.) und Michaelis-Konstanten (K_m) für Thymidin bei der Thymidin-Kinase in myeloischen Zellen bei akuten und chronischen Leukämien.

b) Behandlung des Leucocytencytolysates mit Sephadex G 25:

In den vorangegangenen Versuchen wurde gezeigt, daß und wie Thymidintriphosphat (TTP) die Thymidin-Kinase Reaktion hemmt. Es erhebt sich die Frage, ob die TTP Konzentration in den Zellen hoch genug für diese Hemmung ist.

Um dies zu prüfen, wurde das Leukozyten-Cytolysat auf eine Sephadex G 25 Austauschersäule gegeben (siehe Seite 8) und durch folgendes Eluieren das Enzym von anderen Nucleotiden getrennt.

Es wurde solange mit 0,05M TRIS pH 8,0 eluiert, bis im Durchlauf die gesamte Proteinmenge wieder gefunden war. Bei allen Versuchen trat ein geringes Eiweiß-Defizit auf, das sich nicht verhindern ließ. Anschließend wurde die Thymidin-Kinase im Cytolysat und im Eluat bestimmt.

Pat. Diagnose		Cyto-lysat	Eluat
Her.	Ges.Protein mg	18,0	15,9
chron.Myelose	mg Prot/0,2 ml	1,05	0,45
	S.A.(mμMol/mg Prot.)	0,34	0,65
	Ges.Aktivität	6,12	10,4
Trei.			
chron.Myelose	Ges.Protein mg	12,0	9,22
	mg Prot/0,2 ml	0,6	0,23
	S.A(mμMol/mg Prot.)	0,47	0,6
	Ges.Aktivität	5,64	5,53
Gör.			
paramyel.Leuk.	Ges.Protein mg	50,0	47,3
	mg Prot/0,2 ml	2,0	1,2
	S.A.(mμMol/mg Prot.)	1,1	1,67
	Ges.Aktivität	55,0	79,0

Tab. 3: Enzym-Anreicherung durch Eluieren.

Pat.: Her., weiblich, 42 J., chron.Myelose, periphere Zellen, 41 % Paramyeloblaten.

Pat.: Trei., männlich, 68 J., chron. Myelose, periphere Zellen, 14,5 % Paramyeloblasten.

Pat.: Gör., weiblich, 66 J., akute Leukose, periphere Zellen, 76 % Paramyeloblasten.

Die Ergebnisse der Tabelle 3 zeigen, daß es durch Behandlung des Enzyms mit Sephadex G 25 und folgendem Eluieren gelingt,

einen Hemmfaktor der Thymidin-Kinase an die Säule zu adsorbieren, denn sowohl die spezifische Aktivität bezogen auf mg Protein als auch die Gesamt-Aktivität sind bei den Patienten Her. und Gör. im Eluat höher als im ursprünglichen Cytolysat. Bei Patient Trei. ist nur die spezifische Aktivität bezogen auf mg Protein im Eluat höher als im Cytolysat, die Gesamt-Aktivität ist nahezu gleich. Da bei der Säulenelution mit 0,05M TRIS Nucleotide am Sephadex-Austauscher absorbiert bleiben, ist es hoch wahrscheinlich, daß es sich bei dem Hemmfaktor um TTP. handelt.

3. Inhibitorwirkung normaler Leukocyten auf die Thymidin-Kinase in Leukämiezellen.

Nach MARSH und SEYMOUR (54) und CRADDOCK (25) hemmt ein Cytolysat aus normalen, weißen peripheren Zellen des Blutes die Aktivität der Thymidin-Kinase. Als Ursache dieser Hemmung wird eine Phosphorylase angenommen. Diese Phosphorylase baut Thymidinmonophosphat zu Thymin und Desoxyribose - 1 - Phosphat ab (Gleichung 2).

$$\text{Thymidin} + P_a \xrightarrow{\text{Phosphorylase}} \text{Thymin} + \text{Desoxyribose - 1 - Phosphat}$$

Gleichung 2.

MARSH und SEYMOUR fanden, daß sich diese Phosphorylase reziprok zur Thymidin-Kinase verhält, d.h. sie ist in reifen Zellen am höchsten.

In Tabelle 4 wird gezeigt, wie sich die Enzym-Aktivität verhält, wenn man zu einem üblichen Routine-Ansatz Cytolysate aus normalen Leukocyten steigender Konzentration hinzugibt.

Cytolysat aus normalen Leukocyten (Pat.: Pa.)	S.A. (mμMol/min/10^{10}Zellen)
Routine-Ansatz (Leukämiezellen)	41,1
+ 0,91 x 10^7 normale Leukocyten	25,2
+ 1,83 x 10^7 " "	22,5
+ 2,74 x 10^7 " "	16,2
+ 3,7 x 10^7 " "	11,0
Aktivität der normalen Leukozyten	0,124

Tab. 4: Aktivität der Thymidin-Kinase in Leukämiezellen bei Zusatz von verschiedenen Enzym-Konzentrationen aus normalen Leukocyten.

Pat.: Jü., männl., 27 J., akute Leukose, periph.Zellen 41 % Paramyeloblasten.

Pat.: Pa., Tbc, normale, periphere Leukocyten.

Mit zunehmender Konzentration an normalen Leukocyten-Enzym nimmt die Menge an gebildetem TMP ab, d.h., in den normalen Leukocyten befindet sich entweder ein Inhibitor der Thymidin-Kinase oder ein TMP bzw. Thymidin-metabolisierendes Enzym. Bei letzterem dürfte es sich um die erwähnte Thymidin-Phosphorylase handeln. Da in den lymphatischen Zellen bei chronischen Lymphadenosen nur niedrige Thymidin-Kinaseaktivitäten nachgewiesen werden, wurde in Analogie zum vorangegangenen Versuch die Wirkung von Cytolysat aus Lymphocyten bei einem Patienten mit chronischer Lymphadenose auf die Thymidin-Kinase in akuten Leukämie-Zellen untersucht.

Cytolysat aus Zellen bei chron.Lymphadenose (Pat.Fre)	S.A. ($m\mu$Mol/min/10^{10}Zellen)
Routine-Ansatz (Leukämiezellen)	11,2
+ 0,83 x 10^7 Lymphocyten	10,7
+ 1,67 x 10^7 "	9,25
+ 2,5 x 10^7 "	9,9
+ 3,34 x 10^7 "	8,25
Aktivität des Enzyms aus CLL-Zellen	0,96

Tab. 5: Aktivität der Thymidin-Kinase in Leukämiezellen bei Zusatz von verschiedenen Enzym-Konzentrationen aus Lymphocyten eines Patienten mit chronischer Lymphadenose.

Pat.: Kr., weibl. 54 J., akute Leukose, periphere Zellen, 76 % Paramyeloblasten.

Pat.: Fre.,männl. 62 J., chron.Lymphadenose, periph.Zellen.

Im Vergleich zu normalen Leukocyten wird in den Zellen bei chronischer Lymphadenose eine höhere Thymidin-Kinase-Aktivität gefunden. Dagegen ist jetzt der Hemmeffekt auf die Thymidin-Kinase in akuten Leukämiezellen weit geringer.

Die unterschiedlichen Hemmeffekte von normalen Leukocyten und Lymphocyten bei chronischer Lymphadenose auf die Thymidin-Kinase in akuten Leukämiezellen ist in Abb. 7 dargestellt. Es ist deutlich, daß normale Leukocyten das Enzym stärker hemmen als die Lymphocyten von Patienten mit chronischer Lymphadenose.

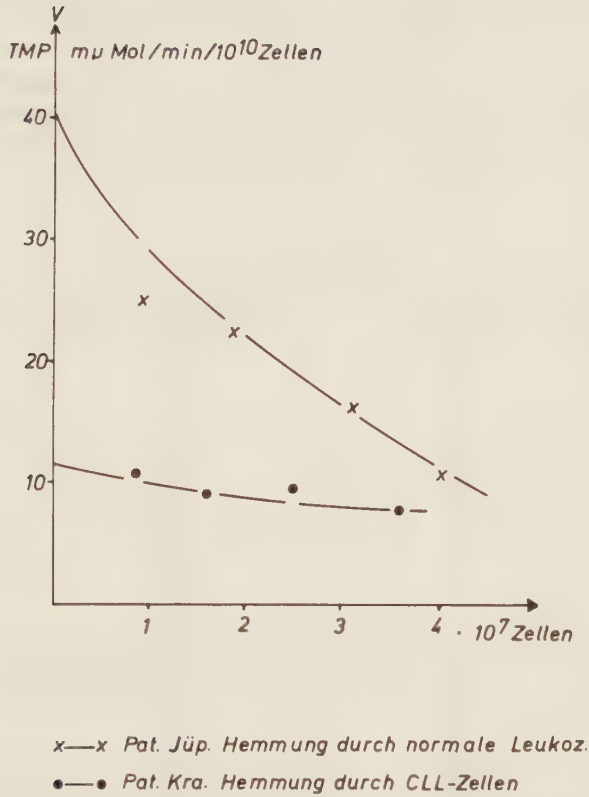


Abb. 7: Hemmende Wirkung von Cytolysat a) aus normalen Leukocyten, b) aus Zellen bei chronischer Lymphadenose auf die Thymidin-Kinase in Paramyeloblasten bei akuten Leukämien.

Pat : Jüp., männlich, 27 J., akute Leukose, periph.Zellen, 41 % Paramyeloblasten.

Pat.: Kra., weiblich, 54 Jahre, akute Leukose, periph.Zellen, 76 % Paramyeloblasten.

4. Beziehung zwischen der Aktivität der Thymidin-Kinase und Anteil myeloischer Vorstufen im peripheren Blut.

Es wurde versucht, eine Beziehung zu finden zwischen der Aktivität der Thymidin-Kinase und dem Anteil unreifer teilungsfähiger Vorstufen im peripheren Blut sowohl bei akuten myeloischen Leukämien als auch bei chronischen myeloischen Leukämien.

a) Akute Leukosen:

Pat.	Paraleukoblasten (%)	S.A. muMol/min/10^{10}Zellen
Dom	78	7,0
Back	21	14,4
Sauer	91	1,6
Na	46	3,6
Kra	76	11,6
Mey	40	8,8
Vei	98	2,0
Wen	77	3,4
Knie	1	2,5
Jüp	41	30,0
Ro	50	33,3
Kle	18	8,2
Pip	4	22,6
Ha	0	2,8
Rol	77	3,6
Schwe	61	8,3
Non	87	19,6
Mun	9	2,9
Bun	93	28,0
Reu	98	15,6
Zitz	22	16,2
Hoe	59	1,9
Lor	57	39,0
Schra	91	36,4
Mag	49	6,8
Gutb.	7	2,2
Rod	77	2,0
Ruo	95	36,8
Lau	98	7,2
Fla	81	10,1
Wag	88	5,2
Masu	20	16,0
Epp	64	15,5

Tab. 6: Gegenüberstellung des Paraleukoblastenanteiles und der Thymidin-Kinaseaktivität in den Leukozyten des peripheren Blutes bei akuten Leukämien.

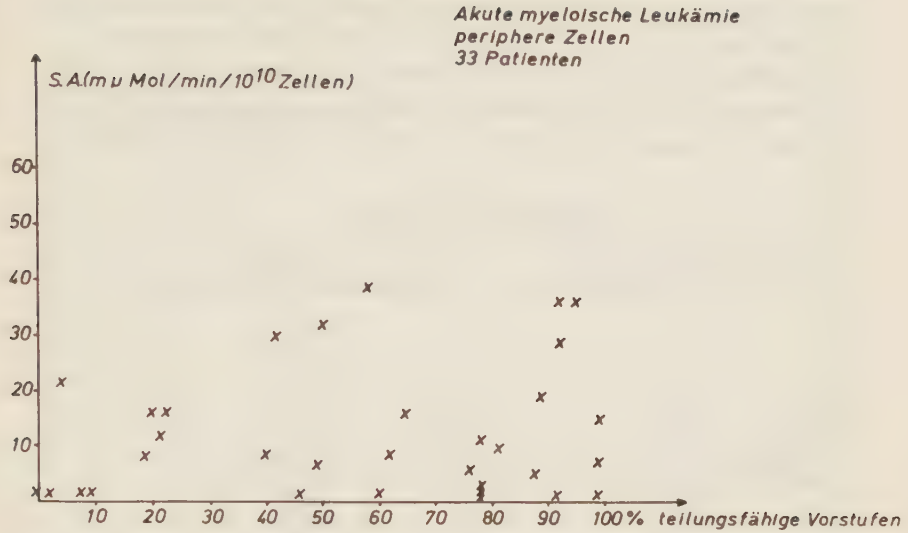


Abb. 8: Abhängigkeit der Thymidin-Kinase von dem Anteil der teilungsfähigen weißen Vorstufen bei akuter myeloischer Leukämie.

Die Abbildung 8 zeigt eindeutig, daß zwischen der Aktivität der Thymidin-Kinase und dem Anteil an Paraleukoblasten im Differentialblutbild bei akuten myeloischen Leukämien keine Korrelation besteht. Eine entsprechende Berechnung nach der Formel

Korrelationskoeffizient

$$r = \frac{\Sigma (x - \bar{x})\ (y - \bar{y})}{\sqrt{\Sigma (x - \bar{x})^2 \Sigma (y - \bar{y})^2}}$$

ergab bei 35 untersuchten Patienten (N = 35, N - 2 = 33 Freiheitsgrade) den Wert von 0,143.

Somit besteht bei den akuten Leukosen auch rechnerisch keine Korrelation zwischen der Aktivität der Thymidin-Kinase und dem Anteil an Paraleukoblasten, denn der geforderte Zufallhöchstwert des Korrelationskoeffizienten beträgt bei 5 % Überschreitungswahrscheinlichkeit 0,3338.(Anhang 1) (Documenta Geigy, wissenschaftl. Tab. S. 61, Jahrg. 1960).

b) Chronische Myelosen:

Pat.	Teilungsfähige Vorstufen (%)	S.A. mμMol/min/10^{10}Zellen
Bar	21	14,4
Flai	16	4,7
Frie	44	11,5
Hur	25	1,4
Kur	25	14,8
SchmRü	20	15,6
SchmRo	42	8,1
Schra	34	16,7
Ram	27	8,7
Gutb	39	24,0
Trei	14,5	2,5
Seeg	42	3,3
Mül	42	2,6
Feuer	53	13,1
Ern	67	10,5
Flei	23	21,6
Gschr.	37	3,7
Herrm	41	2,7
Rais	71	36,0
Trau	5	21,0
Jun	74	13,7
Pero	56	44,4
Gud	28	17,0
Ker	9	12,4
Schai	93	25,2
Ju	1	23,6
Ju	67	24,0

Tab. 7: Gegenüberstellung des Anteils teilungsfähiger myeloischer Vorstufen und der Thymidin-Kinaseaktivität in den Leukozyten des peripheren Blutes bei chronischen Myelosen.

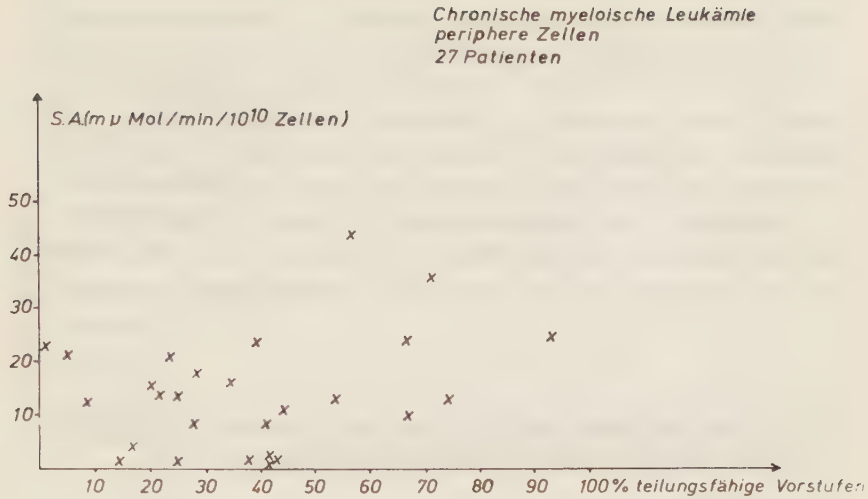


Abb. 9: Abhängigkeit der Thymidin-Kinase von dem Anteil der teilungsfähigen weißen Vorstufen bei chronischer myeloischer Leukämie.

Wie bei den akuten, so wurde auch bei den chronischen Leukosen eine Korrelation zwischen der Aktivität der Thymidin-Kinase und dem Anteil unreifer, teilungsfähiger Vorstufen berechnet. Bei 27 untersuchten Patienten ergab hier der Korrelationskoeffizient

$$r = 0{,}281 \quad (N = 27,\ N - 2 = 25 \text{ Freiheitsgrade})$$

Der geforderte Zufallhöchstwert des Korrelationskoeffizienten beträgt bei 0,5 % und N - 2 = 25 0,3809 (Anhang 2). Somit besteht auch bei den chronischen myeloischen Leukosen in den peripheren Zellen keine Korrelation zwischen der Aktivität der Thymidin-Kinase und dem Anteil unreifer teilungsfähiger Vorstufen.

Ebenso wurde eine Korrelation zwischen der Aktivität der Thymidin-Kinase und dem Anteil unreifer teilungsfähiger Vorstufen aus dem Sternalmark sowohl bei akuter als auch chronischer myeloischer Leukämie berechnet. Beide Male konnte keine Korrelation festgestellt werden. Dieses Ergebnis ist aber nicht ausreichend gesichert, denn a) war der Stichprobenumfang zu klein (bei den akuten Leukosen 13 Patienten, bei den chronischen Leukosen 6 Patienten), b) befanden sich in dem Sternalmark auch Erythrozytenvorstufen, welche das Ergebnis wahrschlich mitbeeinflussen.

Die Thymidin-Kinase in Blut- und Knochenmarkzellen bei verschiedenen hämatologischen Erkrankungen.

In Tabelle 8 werden die durchschnittlichen Aktivitäten der Thymidin-Kinase in normalen Leukozyten und Knochenmarkszellen mit denen bei akuten Leukämien (über 70 % Paraleukoblasten) und bei chronischen Leukämien (über 40 % teilungsfähige Vorstufen)verglichen.

In normalen peripheren Leukocyten ist die Thymidin-Kinase kaum meßbar. Dagegen haben wir deutlich höhere Werte in normalen Markzellen, was auf den höheren Anteil von myeloischen Vorstufen im Mark zurückzuführen ist. Aber auch bei den chronischen Myelosen und noch ausgeprägter bei akuten Leukämien finden wir in den Markzellen bedeutend höhere Werte als in den peripheren Zellen des Blutes (Tabelle 9 und 10).

Aus Tabelle 8 ist auch ersichtlich, daß in den Paramyeloblasten des peripheren Blutes bei akuten Leukämien die Aktivitäten der Thymidin-Kinase etwas niedriger als bei den chronischen Myelosen sind.

Untersuchte Zellen N		Thymidin-Kinase ($\bar{x} \pm s$) ($m\mu Mol/min/10^{10}$Zellen
Normale Leukozyten	5	1
Normale Markzellen	12	10 ± 5
Akute Leukämien:		
periphere Zellen	15	$12{,}0 \pm 12{,}2$
Markzellen	13	40 ± 20
Chronische Myelosen:		
periphere Zellen	13	17 ± 13
Markzellen	9	$24{,}6 \pm 16{,}4$

Tab. 8: Durchschnittliche Aktivitäten der Thymidin-Kinase in weißen Blutzellen und im Knochenmark.

S.A. = mμMol Substratumsatz/min/10^{10}Zellen.

$\bar{x}$ = Mittelwert.

s = Standardabweichung berechnet aus $\pm\sqrt{\frac{\Sigma(x - \bar{x})^2}{N - 1}}$

Diese niedrigen Enzymaktivitäten sind besonders zu bewerten, da bei der Mehrzahl der untersuchten Patienten mit akuten Leukämien die peripheren weißen Blutzellen sich fast ausschließlich aus unreifen Paramyeloblasten zusammensetzten. Bei einigen Patienten mit akuten Leukämien wurden allerdings auch deutlich erhöhte Thymidin-Kinase-Werte in den Paramyeloblasten des Blutes gefunden. Siehe Tabelle 6.

Pat.	S.A. peripher	S.A. Sternum
Frie	2,5	11,5
Trei	2,5	5,6
Mül	2,5	4,4
Feuer	13,1	39,4
Rai	20,2	44,5
Schm	0,88	4,8
Eis	9,6	19,6
Ker	12,4	28,2
Ju	23,6	114
Poh	7,8	20,5

Tab. 9: Gegenüberstellung der Thymidin-Kinase Aktivitäten in den peripheren Zellen des Blutes und Knochenmarkes bei chronischen Myelosen. S.A.: mμMol/min/10^{10}Zellen.

Pat.	S.A. peripher	S.A. Sternum
Rol	3,6	27,2
Höp	18	85
Nonn	19,6	30,8
Mun	2,9	37,2
Ess	3,3	13,6
Bun	28	34,4
Lorb	39	49
Eppl	7,6	37,8
Rod	2	63,4
Ruo	36,8	72
Fla	10,1	23,2
Burg	57,5	115

Tab. 10: Gegenüberstellung der Thymidin-Kinase Aktivitäten in den peripheren Zellen des Blutes und Knochenmarkes bei akuten Leukosen.
A.A. : mμMol/min/10^{10}Zellen.

IV. DISKUSSION

1. Thymidin-Kinase und Proliferation myeloischer Zellen.

Die Thymidin-Kinase phosphoryliert Thymidin, welches entweder aus Nucleotiden entstanden ist (17), oder durch die Nahrung zugeführt wurde (24, 64) zu Thymidinmonophosphat (TMP) Abb. 1). TMP wird mittels der Thymidylat-Kinase über Thymidin-di zum -tri-phosphat phosphoryliert (TTP). TTP wird mittels der DNS-Polymerase in das DNS Molekül eingebaut (33, 62).

BRENT, BUTLER und CRATHORN zeigten in synchronisierten HeLa-Zellkulturen, daß in der DNS-Synthesephase und in der präsynthetischen Phase der Zellteilung ein Anstieg der Thymidin- und der Thymidylat-Kinase vorausgeht (12). Die in Cytolysaten myeloischer Zellen nachgewiesenen Aktivitäten der Thymidin-Kinase verteilen sich somit nicht gleichmäßig auf die Gesamtpopulation, sondern betreffen in erster Linie die Zellen, die sich kurz vor oder in ihrer DNS-Synthesephase befinden. Bei diesen läßt sich autoradiographisch ein Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNS der Kerne nachweisen. NAKAI, MICHAEL, PETTERSON, CRADDOCK (57), GAVOSTO, MARINARI und PILERI (37), FLIEDNER, CRONKITE und BOND (31) und KILLMANN (47) fanden einen besonders niedrigen Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNS in den Paramyeloblasten bei akuten Leukämien im Vergleich zu anderen myeloischen Zellen, besonders bei chronischen Myelosen. Diese Ergebnisse lassen sich im Sinne einer verlängerten Lebensdauer und herabgesetzten Teilungstendenz der Paramyeloblasten bei akuten Leukämien deuten. Diese Hypothese wurde durch Untersuchungen von GROSS und Mitarbeitern (40) unterstützt, indem sie bei akuten Leukämien einen normalen oder erniedrigten Mitose-Index fanden.

BOLL und GANSSEN (9) stellten eine Verlängerung der Mitose bei Phasenkontrastbeobachtung fest, MUELLER (56) eine Er-

niedrigung der Teilungskinetik an der DNS-Verdoppelung in den Einzelzellen.

In dieser Arbeit konnten durch Untersuchung einer größeren Zahl von Patienten die bereits früher von WILMANNS (71) mitgeteilten Ergebnisse bestätigt werden, denen zufolge die Thymidin-Kinase in den Paraleukoblasten des peripheren Blutes bei akuten Leukämien im Vergleich zu normalen Leukocytenvorstufen im Knochenmark kaum höher ist (Tab. 8). Dieses ist um so höher zu bewerten, als der Paraleukoblastenanteil im Differential-Blutbild bei sämtlichen erfaßten Patienten über 70 % lag, der Prozentsatz teilungsfähiger Zellen also erheblich höher als im normalen Knochenmark war. Dagegen finden sich in den unreifen Zellen bei chronischen Myelosen deutlich höhere Enzym-Aktivitäten als bei den akuten Leukosen (Tab. 8). Dieses wiederum ist auffallend, wenn man berücksichtigt, daß bei den chronischen Myelosen im Durchschnitt der Anteil myeloischer Vorstufen geringer war als bei den akuten Leukosen. Weiter fällt auf, daß keine Korrelation zwischen dem Anteil unreifer weißer Vorstufen im peripheren Blut und der Aktivität der Thymidin-Kinase weder bei den chronischen Myelosen, noch bei den akuten Leukosen gefunden werden konnte.

Höhere Aktivitäten der Thymidin-Kinase als im peripheren Blut wurden sowohl bei akuten als auch bei chronischen Leukämien in den Zellen des Knochenmarkes gefunden (Tab. 9 und 10). Bei seinen Untersuchungen der ^{3}H-Thymidin-Aufnahme durch DNS-synthetisierende Zellen fand KILLMANN gleiche Unterschiede (47). Er nimmt an, daß eine Myeloblastenpopulation bei akuten Leukämien sich aus proliferierenden und nichtproliferierenden Zellen zusammensetzt. Erstere finden sich vor allem im Knochenmark. Bei den Myeloblasten im peripheren Blut soll es sich größtenteils um nicht mehr

teilungsfähige Endformen handeln. Daraus kann gefolgert werden, daß die Aktivität der Thymidin-Kinase in den Leukämiezellen des Blutes und der ^{3}H-Thymidin-Markierungsindex abhängen von dem Verhältnis, in dem sich teilende und nicht mehr teilungsfähige Paramyeloblasten vom Knochenmark in das periphere Blut gelangen. Dieses kann die erheblichen Aktivitätsunterschiede der Thymidin-Kinase in den Paramyeloblasten des Blutes verschiedener Patienten mit akuten Leukämien erklären.

2. Thymidin-Kinase und Thymidintriphosphat.

Wie oben beschrieben, nimmt das TTP eine zentrale Stellung im Aufbau der DNS aus Pyrimidinnucleotiden ein: Es hemmt konzentrationsabhängig die Thymidin-Kinase über einen negativen Rückkoppelungsmechanismus und steuert somit die DNS-Synthese (14,20,39). Der Hemmechanismus ist - wie von IVES, MORSE, POTTER (46), BREITMANN (11) und OKAZI (58) gezeigt wurde - und durch die eigenen Untersuchungen bestätigt werden konnte (Abb. 6a - 6d), kompetitiv. Nach MALEY und MALEY hemmt TTP außerdem die enzymatische Bildung von Desoxyuridin-5'-monophosphat (dUMP) aus Desoxycytidin-5'-monophosphat (dCMP) und von Desoxycytidin-5'-monophosphat aus Desoxycytidin (dCR) (53).
Bestimmendes Merkmal dieser - unter unseren Untersuchungsbedingungen - kompetitiven Hemmung ist die Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration und von der Substratkonzentration. Das Ausmaß der Hemmung hängt ab von den relativen Affinitäten von Inhibitor und Substrat zum Enzym.

a) Die Substratkonzentration wird bestimmt durch die Bereitstellung von Thymidin, sei es durch die Nahrung (24, 64), sei es durch Zellabbau (17). Thymidin kann von fast allen Zellen zur DNS-Synthese ausgenutzt werden (33, 62, 64).
b) Die Inhibitorkonzentration wird bestimmt:
   - durch die Bildung von TTP aus Thymidin durch Phosphorylierung,

- durch die Bildung von TTP aus "C_1"-Fragmenten mittels Methylierung und Übertragung dieser auf dUMP unter Beteiligung der FH_2-Reduktase und Thymidylat-Synthetase (71). Indem die FH_2-Reduktase durch Folsäureantagonisten blockiert werden kann (70), ist hiermit eine Erniedrigung der TTP-Konzentration und damit der DNS-Synthese möglich (Abb. 1),
- durch die weitere Verwendung des gebildeten TTP, sei es für die DNS-Synthese, sei es, daß das TTP durch eine Phosphorylase wieder abgebaut wird (28),
- durch den Abbau von Thymidin durch die Thymidin-Phosphorylase bei Anwesenheit von anorganischem Phosphat zu Thymin und Desoxyribose-1-Phosphat (Gleichung 2) (25, 54).

c) Weiter wird eine Gen-bedingte Steuerung der Thymidin-Kinase durch Repression diskutiert (29).

MARSH und PERRY (54) und CRADDOCK (25) fanden, daß auch in leukämischen Zellen Thymidin durch eine Phosphorylase zu Thymin und Desoxyribose-1-Phosphat abgebaut wird. Diese Ergebnisse erklären die erniedrigte Aktivität der Thymidin-Kinase unter der Einwirkung von Cytolysat aus normalen Leukozyten. In diesen befindet sich eine genügend hohe Konzentration an Phosphorylase, die in der Lage ist, die TTP Konzentration zu regulieren (54).

Hohe Konzentrationen an Thymidin-Kinase können gefunden werden
1. in schnell proliferierenden Geweben (4, 10, 43, 69),
2. bei erniedrigter de novo Synthese von Thymidinmonophosphat bei Hemmung der FH_2-Reduktase durch Folsäure-Antagonisten, MORSE und POTTER (55), RUBIN (65) und WILMANNS (70),
3. bei Vitamin B_{12}Mangel, BOCK et al. (8)

Unter solchen Umständen kann die erhöhte Thymidin-Kinase-Aktivität den toxischen Antimetaboliteffekt oder den

Vitaminmangel innerhalb gewisser Grenzen kompensieren.

Auf Grund der beschriebenen Untersuchungen kann angenommen werden, daß die im zellfreien System nachgewiesene Hemmung der Thymidin-Kinase durch Thymidintriphosphat auch in vivo von Bedeutung ist. Entscheidend ist die Frage, ob die in vitro zur Hemmung der Thymidin-Kinase erforderlichen Thymidintriphosphatkonzentrationen auch innerhalb der Zelle erreicht werden. Hierfür spricht die Tatsache, daß nach Absorption der Nukleotide an Sephadex G25 die Gesamtaktivität und die spezifische Aktivität im Eluat deutlich höher sind als im Cytolysat vor der Behandlung mit Sephadex G25-Austauscher (Tab. 3). Es muß somit am Austauscher ein Hemmstoff der Thymidin-Kinase absorbiert worden sein, bei dem es sich mit Wahrscheinlichkeit um Thymidintriphosphat handeln dürfte.

Während TTP die Aktivität der Thymidin-Kinase beeinflußt, wird die Konzentration von TTP auch durch die Aktivität der DNS-Polymerase bestimmt (28). Durch dieses Enzym werden die Desoxyribotidtriphsphate der bei der DNS-Bildung beteiligten Purine und Pyrimidine zu den Nucleotiden verknüpft (49). Nach BOLLUM und POTTER u.a. kommt es kurz vor der DNS-Verdoppelung zu einer Vervielfachung der DNS-Polymerase Aktivität (10). Damit nimmt die TTP-Konzentration ab, wodurch die hemmende Rückkopp_elung von TTP auf die Thymidin-Kinase entfällt. Deren Aktivität steigt daher parallel mit der DNS-Polymerase vor der DNS-Synthese-Phase an, wie von WEISSMANN, SMELLIE und PAUL (69) gezeigt wurde.

V. Z U S A M M E N F A S S U N G

Die Eigenschaften des Enzyms Thymidin-Kinase werden in normalen und leukämischen Zellen des Blutes und des Knochenmarkes untersucht.

1. Die gebildete Menge TMP ist proportional zur eingesetzten

Menge Enzym.
Der Substratumsatz verläuft über 60 Minuten mit gleicher Geschwindigkeit. Das pH-Optimum liegt bei 8,0.
ATP und Mg-Ionen sind essentiell notwendig für die Thymidin-Kinase-Reaktion.

2. Durch TTP wird die Thymidin-Kinase kompetitiv gehemmt. Diese in vitro nachgewiesene Hemmung ist wahrscheinlich auch in vivo von Bedeutung, was durch Abtrennung des Enzyms von Nucleotiden mittels Sephadex-Austauscher und folgender Elution gezeigt wird. Die Gesamtaktivität ist im Eluat höher als im Cytolysat.

3. Durch Cytolysat aus normalen Leukocyten kann die Aktivität der Thymidin-Kinase gehemmt werden. Als Ursache wird eine erhöhte Thymidin-Phosphorylase im Cytolysat normaler Leukocyten angenommen.

4. Während sich in den peripheren reifen Leukocyten keine nennenswerten Aktivitäten der Thymidin-Kinase finden, kann dieses Enzym im normalen und regenerierenden Knochenmark und in myeloischen Zellen bei akuten und besonders bei chronischen Leukämien auch im Blut deutlich nachgewiesen werden. Die Enzymaktivität ist in den unreifen, teilungsfähigen Zellen bei chronischen Myelosen höher, bei den akuten Leukämien meistens niedriger als in normalen Leukocytenvorstufen, wenn man den Anteil teilungsfähiger Vorstufen berücksichtigt. Die Aktivitäten sind auch bei den akuten Leukämien im Knochenmark meistens höher als in den Paraleukoblasten des peripheren Blutes.

5. Es besteht keine signifikante Korrelation zwischen der Aktivität der Thymidin-Kinase und dem Anteil unreifer weißer Vorstufen bei chronischen Myelosen. Ebenso ergibt sich bei akuten Leukämien kein Zusammenhang zwischen der Aktivität der Thymidin-Kinase und dem Paraleukoblastenanteil.

Anhang 1:

Statistische Berechnung der Korrelation zwischen der Aktivität der Thymidin-Kinase und der Prozentzahl der Paraleukoblasten bei akuter Leukämie

Patient	$\bar{x} = 56{,}7$ $x - \bar{x}$	$\bar{y} = 12{,}8$ $y - \bar{y}$	$(x - \bar{x})$	$(y - \bar{y})$	$(x - \bar{x})^2$	$(y - \bar{y})^2$
1. Dom	21,3	- 5,8		-123,5	453,7	33,6
2. Back	-35,7	1,6		- 57,1	1274,5	2,6
3. Sauer	34,3	-11,2		-384,2	1176,5	125,4
4. Hau	-10,7	- 9,2	+ 98,4		114,5	84,6
5. Kra	19,3	- 1,2		- 23,2	372,5	1,4
6. Mey	-16,7	- 4,0	+ 66,8		278,8	16,0
7. Vei	41,3	-10,8		-446,0	1705,7	116,6
8. Wen	20,3	- 9,4		-190,8	412,1	88,4
9. Knie	-55,7	-10,3	+573,7		3102,5	106,1
10. Jüp	-15,7	17,2		-270,0	246,5	295,8
11. Ro	- 6,6	20,5		-135,3	43,7	420,3
12. Kle	-38,7	- 4,6	+178,0		1497,7	21,2
13. Pip	-52,7	9,8		-516,5	2777,3	96,0
14. Ha	-56,7	-10,0	+567,0		3214,9	100
15. Rol	20,3	- 9,2		-186,7	412,1	84,6
16. Schwei	4,3	- 4,5		- 19,4	18,5	20,3
17. Non	30,3	6,8	+206,0		918,1	46,2
18. Mun	-47,7	- 9,9	+472,2		2275,3	98,0
19. Bu	36,3	15,2	+551,7		1317,7	231,1
20. Reu	41,3	2,8	+115,6		17,05,7	7,8
21. Zitz	-34,7	3,4		-117,9	1204,1	11,6
22. Hoeu	2,3	-10,9		- 25,0	5,3	118,8
23. Lorb	0,3	26,2	+ 7,8		0,1	686,4
24. Schra	34,3	23,6	+809,4		1176,5	557,0
25. Magi	- 7,7	- 6,0	+ 46,2		59,3	36,0
26. Gut	-49,7	-10,6	+526,8		2470,1	112,4
27. Ro	20,3	-10,8		-219,2	412,1	116,6
28. Ruo	38,3	24,0	+911,2		1466,9	576,0
29. Lau	41,3	- 5,6		-231,2	1705,7	31,4
30. Fla	24,3	- 2,7		- 65,6	590,5	7,3
31. Wag	31,3	- 7,6		-237,8	979,9	57,8
32. Masu	-36,7	3,2		-117,4	1346,9	10,2
33. Eppl	7,3	2,7	+ 19,7		53,3	7,3
			+5150,0	-3366,8	35788,8	4324,8
			= 1783,2			

$$r = \frac{\Sigma(x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y})}{\sqrt{\Sigma(x - \bar{x})^2 \cdot \Sigma(y - \bar{y})^2}} \quad \frac{1783{,}2}{\sqrt{35789 \cdot 4325}} = \frac{1783{,}2}{\sqrt{154787425}} = \frac{1783{,}2}{12441} = 0{,}143$$

Der geforderte Zufallhöchstwert des Korrelationskoeffizienten beträgt bei 5 % Überschreitungswahrscheinlichkeit 0,3338 .

x = % Myeloblasten, Promyeloblasten, Myelozyten

y = S.A. mµMol/min/10^{10}Zellen.

Anhang 2:

Statistische Berechnung der Korrelation zwischen der Aktivität der Thymidin-Kinase und der Prozentzahl der Paraleukoblasten bei chronischer Myelose.

Patient	$\bar{x} = 37$ $x - \bar{x}$	$\bar{y} = 14{,}7$ $y - \bar{y}$	$(x - \bar{x})$	$(y - \bar{y})$	$(x - \bar{x})^2$	$(y - \bar{y})^2$
1. Bar	-16	- 0,3	+ 4,8		256	0,09
2. Fla	-21	-10,0	+210		441	100
3. Frie	7	- 3,2		- 22,4	49	10,2
4. Hu	-12	-13,3	+159,6		144	176,9
5. Ku	-12	0,1		- 1,2	144	0,01
6. SchmiRü	-17	0,9		- 15,3	289	0,81
7. SchmiRo	5	- 6,6		- 33,0	25	43,6
8. Schra	- 3	2,0		- 6,0	9	4
9. Ram	-10	6,0		- 60	100	36
10. Gut	2	9,3	+ 18,6		4	86,5
11. Trei	-22,5	-12,2	+274,5		506	148,8
12. See	5	-11,4		- 57,0	25	130
13. Mül	5	-12,1		- 60,5	25	146,4
14. Feuer	16	- 1,6		- 25,6	256	2,6
15. Ern	30	- 4,2		-126,0	900	17,6
16 Flei	-14	6,9		- 96,6	196	47,6
17. Gschr.	0	-11,0	0		0	121
18. Herm	4	-12,0		- 48,0	16	144
19. Rai	34	21,3	+724,2		1156	453,7
20. Trau	-32	6,3		-201,6	1024	39,7
21. Ju	37	- 1,0		- 37,0	1369	1
22. Per	19	29,7	+564,3		361	882,1
23. Gud	- 9	2,3		- 20,7	81	5,3
24. Ke	-28	- 2,3	+ 64,4		784	5,3
25. Schai	56	10,5	+588		3136	110,3
26. Ju	-36	8,9		-320,4	1296	79,2
27. Ju	30	9,3	+279,0		900	86,5
			+2887,4	-1131,3	2879,2	13492
			= 1756,1			

$$r = \frac{(x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y})}{(x - \bar{x})^2 \cdot (y - \bar{y})^2} \quad \frac{1756{,}1}{13492 \cdot 2879{,}2} = \frac{1756{,}1}{38846167} = \frac{1756{,}1}{6240} = \underline{0{,}281}$$

Der geforderte Zufallhöchstwert des Korrelationskoeffizienten beträgt bei 5 % Überschreitungswahrscheinlichkeit 0,3809.

x = % Myeloblasten, Promyelozyten, Myeloblasten

y = S.A. mµMol/min/10^{10}Zellen.

Anhang 3:

Durchschnittliche Aktivität der Thymidin-Kinase und mittlerer Fehler in den peripheren Zellen bei akuten myeloischen Leukämien (über 70 % Paraleukoblasten):

x	$\bar{x}$	$x - \bar{x}$	$(x - \bar{x})^2$
7		- 5	25
1,6		-10,4	108
11,6		- 0,4	0,16
2,0		-10,0	100
3,4		- 8,6	74
3,6		- 8,4	71
19,6		7,6	58
28,0		16,0	256
15,6		3,6	13
36,4	12,0	24,4	595
2,0		-10	100
36,8		24,8	615
7,2		- 4,8	23
10,1		- 1,9	3,6
5,2		- 6,8	46
190,1			2088
190 : 15 = 12			

$$\sqrt{\frac{\leq(x - \bar{x})^2}{N - 1}} \quad \sqrt{\frac{2088}{14}} = \sqrt{149} = \pm 12{,}2$$

Durchschnittliche Aktivität $\bar{x} = \underline{\underline{12{,}0}}$ mμMol/min/10^{10}Zellen

Mittlerer Fehler $s = \pm 12{,}2$ mμMol/min/10^{10}Zellen

Anhang 4:

Durchschnittliche Aktivität der Thymidin-Kinase und mittlere Fehler in den Markzellen bei akuten myeloischen Leukämien (über 70 % Paraleukoblasten):

x	$\bar{x}$	$x - \bar{x}$	$(x - \bar{x})^2$
65		25	625
4		-36	1296
32		- 8	64
27		-13	169
26		-14	196
34	40	- 6	36
34		- 6	36
49		9	81
39		- 1	1
63		23	529
72		32	1024
23		-17	289
62		22	484
530 : 13 = 40			4830

$$\sqrt{\frac{\Sigma(x - \bar{x})^2}{N - 1}} \sqrt{\frac{4830}{12}} = \sqrt{402} = \pm 20$$

Durchschnittliche Aktivität $\bar{x} = \underline{\underline{40}}$ mμMol/min/10^{10}Zellen

Mittlerer Fehler $s = \pm 20$ mμMol/min/10^{10}Zellen

Anhang 5:

Durchschnittliche Aktivität der Thymidin-Kinase und mittlerer Fehler in den peripheren Zellen bei chronischen Myelosen (über 40 % Paraleukoblasten).

x	$\bar{x}$	$x - \bar{x}$	$(x - \bar{x})^2$
11,5		- 5,5	30
8,1	17	- 8,9	79
3,3		-13,7	188
2,6		-14,4	207
13,1		- 3,9	15
10,5		- 6,5	42
21,6		4,6	21
2,7		-14,3	204
36,0		19	361
13,7		- 3,3	11
44,4		27,4	751
25,2		8,2	67
24,0		7	49
216,7 : 13 = 17			2025

$$\sqrt{\frac{\Sigma (x - \bar{x})^2}{N - 1}} \quad \sqrt{\frac{2025}{12}} = \sqrt{169} = \pm 13$$

Durchschnittliche Aktivität $\bar{x} = \underline{\underline{17}}$ mμMol/min/10^{10}Zellen

Mittlerer Fehler $s = \pm 13$ mμMol/min/10^{10}Zellen

Anhang 6:

Durchschnittliche Aktivität der Thymidin-Kinase und mittlerer Fehler in den Markzellen bei chronischen Myelosen (über 40 % Paraleukoblasten).

x	$\bar{x}$	$x - \bar{x}$	$(x - \bar{x})^2$
11,5		-13,1	171,6
5,6		-19,0	361,0
4,4		-20,2	408,0
39,4	24,6	14,8	219,0
44,5		19,9	396,0
48		23,4	547,6
19,6		5,0	25,0
28,2		3,6	12,9
20,5		- 4,1	316,8
221,7 : 9 = 24,6			2157,9

$$\sqrt{\frac{\Sigma(x - \bar{x})^2}{N - 1}} \quad \sqrt{\frac{2157,9}{8}} = \sqrt{269,7} = 16,4$$

Durchschnittliche Aktivität $\bar{x} = 24,6$ mµMol/min/10^{10}Zellen

Mittlerer Fehler $s = \pm 16,4$ mµMol/min/10^{10}Zellen

L I T E R A T U R

1. BEHKI, R.M., W.S. MORGAN: Studies on the Phosphorylation of Thymidine in Regenerating Rat Liver. Arch.Biochem.Biophys. 107, 427-434 (1964).

2. BELTZ, R.E.: Comparison of the Content of Thymidylate Synthetase, Desoxycytidylate Desaminase and Deoxyribonucleoside Kinases in Normal and Regenrating Rat Liver. Arch.Biochem.Biophys. 99, 304 (1962).

3. BIANCHI, P.A., J.A. BUTLER, A.R. CRATHORN and K.V. SHOOTER: The Thymidine Phosphorylating Kinase. Biochim.Biophys.Acta 48, 213-214 (1961) and 53, 123-131 (1961).

4. BIANCHI, P..A.: Thymidine Phosphorylation and Desoxyribonucleic Acid Synthesis in Human Leucemic Cells. Biochim.Biophys.Acta 55, 547 (1962).

5. BLAKELEY, R.L., B.M. McDOUGALL: The Biosynthesis of Thymidylic Acid II, III: Purification of Thymidylate Synthetase and its Spectophotometric Assay. J.Biol.Chem. 237, 812-818 (1962).

6. BLAKLEY, R.L.: The Biosynthesis of Thymidylic Acid IV: Further Studies on Thymidylate Synthetase. J.Biol.Chem. 238, 2113-2118 (1963).

7. BLAKLEY, R.L., B.vR.RAMASASTRI, B.M. McDOUGALL: The Biosynthesis of Thymidylic Acid. V: Hydrogen Isotope Studies with Dihydrofolic Reductase and Thymidylate Synthetase. J.Bio.Chem. 238, 3075-3079 (1963).

8. BOCK, H.E., J. HARTJE, D. MÜLLER, W. WILMANNS: Thyminnucleotid-Synthese und Proliferation von Knochenmarkszellen bei myeloblastären Anämien unter der Einwirkung von Vitamin B_{12}. Klin.Wschr. 45, 176 -188 (1967).

9. BOLL, I. und O. GANSSEN: Die Mitosedauer der Paraleukoblasten. Acta haemat. 27, 229-236 (1962).

10. BOLLUM, F.J. and V.R. POTTER: Incorporation of Thymidine into Desoxyribonucleic Acid by Enzymes form Rat Tissues. J.Biol.Chem. 233, 478-482 (1958).

11. BREITMANN, T.R.: The Feed Back Inhibition of Thymidine Kinase. Biochim.Biophys.Acta 67, 153-155 (1963).

12. BRENT, T.P., J.A.V. BUTLER and A.R. CRATHORN: Variations in Phosphokinase Activites During the Cell Cycle in Synchronous Populations of Hela Cells. Nature 207, 176-177 (1965).

13. BREITMANN, T.R., P.SEYMOUR and R.A. COOPER: Pyrimidine Metabolism in Human Leukocytes III: The Utilization of Thymine for DNA-Thymine Synthesis by Leukemic Leukocytes. Canc.Res. 26, 2282-2285 (1966).

14. BRESNICK, E. and R.J. KARJALA: Endprodukt Inhibition of Thymidine Kinase Activity in Normal and Leucemic Leucocytes. Canc.Res. 24, 841-846 (1964).

15. BRESNICK, E., U.B. THOMPSON, H.P. MORRIS and A.G. LIEBELT: Inhibition of Thymidine Kinase Activity in Liver and Hepatomas by TTP and d-CTP. Biochem.and Biophys.Res.Comm.16, 278-284 (1964).

16. BRESNICK, E., U.B. THOMPSON: Properties of Deoxythymidine Kinase Partially Purified from Animal Tissues. J.Biol.Chem.240, 3967-3974 (1965).

17. BRYANT, B.J.: In Vivo Reutilization of the DNA-Thymidine of Necrotized Liver Cells by Cells of Testis and Intestine. Exp. Cell Res. 32, 209-212 (1964).

18. BÜCHER, T., G. PFLEIDERER: Pyruvate Kinase from Muscle. Methods in Enzymology Vol. I, 435-440 S.P.Colowick and N.O.Kaplan Acad. Press New York 1955.

19. BÜCHER, T.: Über ein phosphatübertragendes Gärungsferment. Biochim.Biophys.Acta 1, 292-314 (1948).

20. BUKOVSKY, J., J.S.ROTH: Some Factors Affecting Thymidine and Thymidylate Kinase Activity in Normal Rat Liver and Some Hepatomas. Federat.Proc. 23, 278 (1964).

21. BUKOVSKY, J., J.S. ROTH: Some Factors Affecting the Phosphorylation of Thymidine by Transplantable Rat Hepatomas. Canc.Res. 25/I, 358-364 (1965).

22. CANELLAKIS, E.S., J.J. JAFFE, R. MONTSAVINOS and J.S. KRAKOW: Pyrimidine Metabolism. A Comparison of Normal and Regenerating Rat Liver. J.Biol.Chem. 234, 2096-2099 (1959).

23. CAVALLI-SFORZA,L: Grundbegriffe der Biometrie. Gustav Fischer Verlag Stuttgart 1964.

24. COOPER, R.A., P. SEYMOUR and T.R. BREITMANN: Pyrimidine Metabolism in Human Leukocytes I. Contribution of Exogenous Thymidine and its Effect on Thymine Nucleotide Synthesis in Leukemic Leukocytes. Canc.Res. 26, 2267-2275 (1966).

25. CRADDOCK, C.G.: The Physiology of Granulocytic Cells in Normal and Leukemic States. Amer.J.Med. 28, 711 (1960).

26. DOMAGK, G.E.: in: E.HARBERS: Die Nucleinsäuren. Gerog Thieme Verlag Stuttgart 1964.

27. McDOUGALL, B.M., R.L. BLAKELEY: The Biosynthesis of Thymidylic Acid I. Preliminary Studies with Extracts of Streptococcus Faecalis. J.Biol.Chem. 236, 832-837 (1961).

28. EKER, P.: Activities of Thymidine Kinase and Thymidine Deoxyribonucleotide Phosphatase During Growth of Cells in Tissue Culture. J.Biol.Chem. 240, 2607-2611 (1965).

29. EKER,P.: Studies on Thymidine Kinase of Human Liver Cells in Culture. J.Biol.Chem.241, 659-662 (1966).

30. FIALA, S.,A.FIALA, G. TOBAR and H. MCQUILLA: Deoxynucleotidase Activity in Rat Liver and Certain Tumors. J.Nath.Cancer Inst. 28, 1269 (1962).

31. FLIEDNER, T.M., E.P. CRONKITE, V.P. BOND: Die Proliferationsdynamik der Blutzellbildung autoradiographisch untersucht mit Tritium markiertem Thymidin. Schweiz.med.Wschr. 89,1061-1066 (1959).

32. FRIEDKIN, M., D.W. ROBERTS: The Enzymatic Synthesis of Nucleosides I. Thymidine Phosphorylase in Mammalian Tissue. J.Biol.Chem. 207, 245-256 (1954).

33. FRIEDKIN, M., H. WOOD: Utilization of Thymidine-C^{14} by bone Marrow Cells and isolated thymus nuclei. J.Biol.Chem. 220, 634-651 (1956).

34. FRIEDKIN, M.: The Transfer of H_3 from Tritiated Tetrahydrofolic Acid to Thymidylic Acid. Feder.Proc.18, 230 (1959).

35. FRIEDKIN, M., E.J. CRAWFORD, E. DONOVAN, E.J. PASTORE: The Enzymatic Synthesis of Thymidylate. III. The Further Purification of Thymidylate Synthestase and its Separation from Natural Fluorescent Inhibitors. J.Biol.Che. 237, 3811-3814 (1962).

36. FRIEDKIN, M.; Assay of Thymidylate Synthetase Activity. In: S.P. Colowick and N.O.Kaplan: Methods in Enzymology Vol. VI, 124 Acad.Press New York 1963.

37. GAVOSTO, E., E. MARINARI and A. PILERI: Nucleic Acids in Protein Metabolism in Acute Leucemia Cells. Blood 16, 1555-1563 (1960).

38. GERHART, J.C., A.B. PARDEE: The Enzymology of Control by Feed Back Inhibition. J.Biol.Chem. 237, 891-896 (1962).

39. GREEN, M., M. PINA, V. CHAGOYA: Biochemical Studies on Adenovirus Multiplication. J.Biol.Chem. 239, 1188-1197 (1964).

40. GROSS, R., E. GRUNDMANN, H. BREHMKE, J. KAHLSDORF und U. BOCK: Art und Intensität der Zellvermehrung bei akuten Leukosen. Klin.Wschr. 89, 392-400 (1962).

41. HEIDELBERGER,Ch.: Fluorinated Pyrimidines, Biochemically and Clinically Useful Antimetabolites. 17.Colloq.Ges.Phys.Chem.Mosbach 1966.

42. HEINRICH, M.R., D.W. WILSON: The Biosynthesis of Nucleic Acid Components Studied with C^{14}-Purines and Pyrimidines in the Rat. J.Biol.Chem. 186, 447-460 (1950).

43. HIATT, H.H., T.B. BOJARSKI: Stimulation of Thymidylate Kinase Activity in Rat Tissues by Thymidine Administration. Biochem.Biophys.Res.Com.2, 35-39 (1960).

44. JONES, M.E., L. SPECTOR: The Pathway of Carbonate in the Biosynthesis of Carbamylphosphate. J.Biol.Chem. 235, 2897-2901 (1960).

45. JONES, M.E., L. SPECTOR, F. LIPMANN: Carbamylphosphate, the Carbamyl Donor in Enzymatic Citrulline Synthesis. J.Amer.Chem.Soc. 77, 819-820 (1955).

46. IVES, D.H., P.A. MORSE and V.R. POTTER: Feed Back Inhibition of Thymidine Kinase by Thymidine Triphosphate. J.Biol.Chem. 238, 1467-1474 (1963).

47. KILLMANN, S.A.: Proliferative Activity of Blast Cells in Leucemia and Myelofibrosis. Acta med.Scand. 178, 263-280 (1965).

48. LAGERKVIST, U., P. REICHARD, G. EHRENSVARD: Aspartic Acid as a Precursor for Ribonucleic Acid Pyrimidines. Acta chem.Scand. 5, 1212 (1951).

49ö. LEHMANN, I R., M.J. BESSMAN, E.S. SIMMS and A. KORNBERG: Enzymatic Synthesis of Desoxyribonucleic Acid. I. Preparation of Substrates and Partial Purification of an Enzyme from Escherichia Coli. J.Biol.Chem. 233, 163-170 (1958).

50. LINEWEAVER, J.R., D. BURK: The Determination of Enzyme Dissociation of Thymidine Constants. J. Amer.Chem.Soc. 56, 658 (1934).

51. LOHMANN, K. and O. MEYERHOF: Über die enzymatische Umwandlung von Phosphoglycerinsäure in Brenztraubensäure und Phosphorsäure. BiochemZ. 273, 60-72 (1934).

52. MALEY, F., G.F. MALEY: Nucleotide Interconversions. J.Biol.Chem. 235, 2968-2970 (19 60).

53. MALEY, F., G.F. MALEY: On the Nature of Asparing Effect by Thymidine on the Utilisation of Deoxycytidine. Biochemistry 1, 847-851 (1962).

54. MARSH,I., and S. PERRY: Thymidine Catabolism by Normal and Leucemic Human Leucocytes. J.Clin.Invest. 43, 267-278 (1964).

55. MORSE, P.A., J.R. POTTER, and V.R. POTTER: Pyridine Metabolism in Tissue Culture Cells Derived from Rat Hepatomas. I. Suspenison Cell Cultures Derived from the NOVIKOFF Hepatoma. Canc.Res. 25, 499-508 (1965).

56. MÜLLER, D.: Desoxyribonucleinsäurebestimmung in den Leukocyten der normalen und leukämischen Granulopoese. Klin.Wschr. 42, 224-233 (1964)..

57. NAKAI, G.S., E. MICHAEL, M. PETERSON, C.G. GRADDOCK: Thymidine and Thymidylate Kinase and Thymidylate Phosphatase in Human Leukemic Leukocytes. Clin.Chim.Acta 14, 422-425 (1966).

58. OKAZI, R., A. KORNBERG: Deoxythymidine Kinase of Escherichia Coli. J.Biol.Chem. 239, 275-284 (1964).

59. PASTORE, E J., M. FRIEDKIN: The Enzymatic Synthesis of Thymidylate II: Transfer of Tritium from Tetrahydrofolate to the Methyl Group of Thymidylate. J.Biol.Chem.237, 3802-3810 (1962).

60. POTTER, V.R , H.C. PITOT, A.B. McELYA, P.A. MORSE: Alternative Pathway for Biosynthesis of Thymidylic Acid. Feder.Proc. 19, 312 (1960).

61. POTTER, R.L., O.F. NYAGAARD: The Conversion of Thymidine to Thymidine Nucleotides and Desoxyribonucleic Acid in Vivo. J.Biol.Chem. 238, 2150-2155 (1963).

62. RACHMELER, M., J. GERHART, J. ROSNER: Limited Thymidine Uptake in Escherichia Coli due to an Inducible Thymidine Phosphorylase. Biochim.Biophys.Acta 49, 222-225 (1961).

63. REICHARD, P., U. LAGERKVIST: The Biogenesis of Oriotic Acid in Liver Slices. Acta chem.Scand. 7, 1207-1217 (1953).

64. ROBINSON, S.H., G. BRECHER: Delayed Incorporation of Tritiated Thymidine into DNA. Science 142, 392-393 (1963).

65. RUBINI, J.R.: In Vitro DNA-Labeling of Bone Marrow and Leukemic Blood Leukocytes with Tritiated Thymidine. II. ^{3}H-Thymidine Biochemistry in Vitro. J.Lab.Clin.Med. 68, 566-576 (1966).

66. v.SACHSENMAIER,W.: Regulation der Thymidin-Kinase im Zellteilungszyklus. 17.Colloq.Ges.Phy.Chem.Mosbach 1966.

67. WAHBA, A.J., M. FRIEDKIN: Direct Spectrophotometric Evidence for the Oxydation of Tetrahydrofolate During the Enzymatic Synthesis of Thymidylate. J.Biol.Chem. 236,PC 11-12 (1961).

68. WAHBA, A.J., M. FRIEDKIN: The Enzymatic Synthesis of Thymidylate. I. Early Steps in the Purification of the Thymidylate Synthetase of Escherichia Coli. J.Biol.Chem. 237, 3794-3801 (1962).

69. WEISSMANN, S.M , R.M.S. SMELLIE, J. PAUL: Studies on the Biosynthesis of Deoxyribonucleic Acid by Extracts of Mammalian Cells. IV. The Phosphorylation of Thymidine. Biochim.Biophys.Acta 45, 101 (1960).

70. WILMANNS.W.: Dihydrofolat-Reductase und Thymidin-Kinase im Knochenmark unter der Einwirkung von Folsäureantagonisten. Klin.Wschr. 45, 987-994 (1967).

71. WILMANNS, W.: Die Thymidin-Kinase in normalen und leukämischen myeloischen Zellen. Klin.Wschr. 45, 505-511 (1967).

72. WILMANNS, W.: Biochemie normaler und leukämischer weißer Blutzellen. Z.Klin.Chem.u.Klin.Biochem.5, 233-241 (1967).

73. YATES, R.A., A.B. PARDEE: Control of Pyrimidine Biosynthesis in Escherichia Coli by a Feed-Back Mechanism. J.Biol.Chem. 221, 757-770 (1956).

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. H. E. Bock, dem Direktor der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, für die Möglichkeit, an seiner Klinik die vorliegende Dissertation zu verfassen.

Besonders danke ich meinem Doktor-Vater, Herrn Doz. Dr.med. W. Wilmanns für die freundliche Überlassung des Themas, für die Beratung und die kritische Durchsicht der Arbeit.

Außerdem erhielt ich durch eine Zwischenbeurteilung des experimentellen Teils dieser Arbeit ein Honnef-Stipendium, wofür ich meinem Lehrer sehr dankbar bin.

Lebenslauf

Am 16. 8. 1938 wurde ich, Bernd Frederich, als Sohn des Dr. jur Otto Frederich und seiner Ehefrau Ruth Frederich, geb. Hülsberg, in Stolp/Pommern geboren. 1946 gelangten wir in die Schweiz, wo ich in Zollikon bei Zürich die Volksschule, von 1951 - 1955 das kantonale Real-Gymnasium Zürich besuchte und anschließend 2 Jahre im Privatinstitut Tschulok war. Im Herbst 1957 bestand ich die eidgenössische Maturitätsprüfung in St. Gallen; im Frühjahr 1958 die Ergänzungsprüfung in München.

Von 1958 bis 1961 war ich als Soldat auf Zeit bei der Bundeswehr. Im SS 1961 begann ich das Studium der Medizin und Zahnmedizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen. Im Frühjahr 1962 bestand ich das Vorphysikum, im Frühjahr 1964 das Physikum in Medizin und Zahnmedizin, beide Prüfungen in Tübingen.

Während der ersten beiden klinischen Semester studierte ich in Zürich Medizin, anschließend bis zum Staatsexamen wieder in Tübingen. Im August 1967 bestand ich an der Universität Tübingen das Medizinische Staatsexamen.